



Europäisches Patentamt  
Eur pean Patent Office  
Office européen des brevets

Veröffentlichungsnummer: **0 369 292 A1**

**EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

Anmeldenummer: 89120602.1

Int. Cl. C12Q 1/58

Anmeldetag: 07.11.89

Priorität: 15.11.88 DE 8814264 U

Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
23.05.90 Patentblatt 80/21

Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB IT LI NL SE

Anmelder: Röhm Pharma GmbH  
Dr.-Otto-Röhm-Strasse 2-4  
D-6108 Weiterstadt 1(DE)

Erfinder: Rothgang, Gerhart  
Im Röhrge wann 1  
D-6109 Mühlthal(DE)  
Erfinder: Mann, Helmut-Josef  
Im Häfer Feld 14  
D-6086 Riedstadt(DE)  
Erfinder: Klein, Cornelia J.  
Tulpenweg 12  
D-6755 Alzenau/Wasserlos(DE)

**Diagnostische Dosierungseinheit zur Ureasebestimmung:**

Zur Ureasebestimmung dient eine wasserfreie Dosierungseinheit, vorzugsweise in Form eines festen Komprimats, die Harnstoff, eine Puffersubstanz für den Bereich pH 5,0 - 7,5 und einen pH-Indikator, der im pH-Bereich 5,5 - 8,5 einen Farbumschlag hat, in einer zur Ureasebestimmung geeigneten Menge enthält.

EP 0 369 292 A1

Die Erfindung b trifft ein diagnostisches Hilfsmittel in Form einer festen Dosierungseinheit zur Bestimmung von Urease. Die Zersetzung von Harnstoff zu Ammoniak und Kohlendioxyd durch das Enzym Urease wird analytisch sowohl zur Bestimmung von Harnstoff mittels Urease enthaltender Reagenzmischungen als auch zur Bestimmung von Urease mittels Harnstoff enthaltender Reagenzmischungen angewendet.

#### Stand der Technik

Die Bestimmung von Urease in Biopsaten der Magenschleimhaut hat Bedeutung bei der Diagnose von Magenkrankungen, die durch Infektionen mit *Campylobacter pyloridis* verursacht sind. Die Anwesenheit dieses Bakteriums wird häufig diagnostiziert, indem man ein Biopsat der Magenschleimhaut in ein Harnstoff enthaltendes Kulturmedium einbringt und einen Farbindikator zum Nachweis von Ammoniak zusetzt. In diesem Falle stammt die Urease aus den im Kulturmedium gewachsenen Keimen. Ein für diese Bestimmung geeignetes Kulturmedium ist als Christensen-Harnstoffagar (vgl. W.B. Christensen, Journ. Bact., 52, S.461, 1948) bekannt.

Gemäß EP-A 204 438 wird eine wäßrige Reagenzmischung aus Harnstoff, einem Bactericid und einem Farbindikator zum Nachweis von Urease eingesetzt. Das Bactericid unterbindet jegliches Keimwachstum, so daß nur der Urease-Gehalt der untersuchten Probe festgestellt wird, jedoch nicht die erst im Testmedium durch eingebrachte ureasebildende Keime entwickelte Urease.

Die Handhabung der wäßrigen Reagenzmischung erweist sich jedoch in der Laborpraxis als verhältnismäßig aufwendig. Daher wurde in dem genannten Dokument vorgeschlagen, das wäßrige Medium durch gelbildende Zusätze, wie Agar, in einen halbfesten Zustand zu bringen. In dieser Form werden Dosierungseinheiten für Einzelbestimmungen in wasserdichte und verdunstungsgeschützte Packungen eingeschlossen. Wegen der hohen Anforderungen an die Verpackung können deren Kosten diejenigen für die Reagenzmischung selbst weit übertreffen.

Durch die Anwesenheit von Wasser wird allerdings der Harnstoff langsam zersetzt, wodurch Ammoniak freigesetzt und ein vorzeitiger Farbumschlag bewirkt wird. Um dies zu verhindern, enthalten die bekannten Präparate einen Puffer, welcher einen pH-Anstieg bei der Freisetzung von Ammoniak verhindert. Da der Urease-Nachweis aber gerade auf der Feststellung der Ammoniakfreisetzung beruht, muß die Menge des Puffers so bemessen werden, daß er zwar eine geringe Menge von hydrolytisch erzeugtem Ammoniak abfängt, aber bei

einer größeren Menge Ammoniak, die beim Urease-Test gebildet wird, einen pH-Anstieg und einen Farbumschlag des Indikators zuläßt. Wird die Puffermenge niedrig bemessen, so ist die Pufferkapazität gering und die Lagerfähigkeit der Packung entsprechend begrenzt; nach Verbrauch des Puffers tritt Farbumschlag infolge der weitergehenden Harnstoffhydrolyse ein. Wird die Puffermenge höher bemessen, so fängt bei der Anwendung einer frisch bereiteten Testpackung der Puffer das durch Urease gebildete Ammoniak solange ab, bis er verbraucht ist. Erst danach kann ein Farbumschlag auftreten. Dadurch wird die Geschwindigkeit der Prüfung vermindert und vor allem ihre Empfindlichkeit deutlich verschlechtert.

#### Aufgabe und Lösung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, für die Urease-Bestimmung eine verbesserte Dosierungseinheit bereitzustellen, die für Einzelbestimmungen leicht zu handhaben, einfach zu verpacken und unbegrenzt lagerfähig ist, eine hohe Empfindlichkeit hat und das Ergebnis schnell erkennen läßt.

Diese Ziele werden bei einer Dosierungseinheit zur Durchführung einer Ureasebestimmung mittels einer Reagenzmischung mit einem Gehalt an

a) Harnstoff

b) einer kleinen Menge einer Puffersubstanz für den Bereich pH 5,0 - 7,5,

c) und einen pH-Indikator, der im pH-Bereich zwischen 5,5 und 8,5, jedoch oberhalb des Pufferbereichs einen Farbumschlag hat,

dadurch erreicht, daß die Dosierungseinheit frei von Wasser ist und wenigstens die Bestandteile a und b in einer zur Ureasebestimmung geeigneten Menge enthält. Die Dosismengen werden auf den Bedarf für eine Einzelbestimmung an einem Magenschleimhaut-Biopsat oder für eine definierte Mehrzahl solcher Bestimmungen bemessen.

Zur besseren Erläuterung der Erfindung dienen die Figuren 1 und 2:

Figur 1 zeigt den Querschnitt durch eine erfindungsgemäße Dosierungseinheit in Form eines Komprimats im vergrößerten Maßstab.

Figur 2 stellt schematisch eine Prüfanordnung dar.

Figur 3 zeigt im vergrößerten Querschnitt eine mit der Reagenzmischung gefüllte Steckkapsel.

#### Wirkung und Vorteile der Erfindung

Die Dosierungseinheit ist dem Gebrauchszweck optimal angepaßt, da sie als abgeschlossene, feste Dosierungseinheit einfach zu handhaben

und durch die Anwendung einfacher Herstellungsverfahren für pharmazeutische Dosierungseinheiten billig herstellbar ist. Vor allem ist durch die Abwesenheit von Wasser die Gefahr der Hydrolyse des Harnstoffs während der Lagerung ausgeschlossen. Ebenso ist eine Veränderung der Beschaffenheit durch Verdunsten von Wasser ausgeschlossen. Daraus ergibt sich eine nahezu unbegrenzte Lagerfähigkeit bei sachgerechten Lagerungsbedingungen. Durch einen verminderten Bedarf an Puffersubstanzen ist die Ureasebestimmung schneller, sicherer und genauer.

Die bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Dosierungseinheit ist die Form des Komprimats, das die trockenen Bestandteile der Reagenzmischung in verpreßter Form, in der Regel als Tablette, enthält. Sie können jedoch auch als Pulvermischung in geeignete Kapseln aus Hartgelatine oder einem anderen wasserlöslichen oder leicht zerstörbaren Werkstoff abgefüllt sein. Zur Verpackung der Dosierungseinheiten sind alle Verpackungsmittel, die üblicherweise für Tabletten, Kapseln und dergleichen verwendet werden, verwendbar, wie Fläschchen oder Röhrchen, Blisterpackungen oder folienversiegelte Prüfnäpfchen, in denen die Ureasebestimmung durchgeführt werden kann.

Zur Durchführung einer Ureasebestimmung mittels eines Komprimats wird das zu prüfende Biopsat auf das Komprimat aufgebracht und mit einem oder einigen Tropfen Wasser befeuchtet. Die in der Reagenzmischung enthaltene Puffersubstanz dient allein dazu, in dem wäßrigen Prüfmedium einen für die Reaktion günstigen pH-Wert von 5,0 bis 7,5, vorzugsweise 6,5 bis 7,0, einzustellen. Die dafür erforderliche Menge ist außerordentlich gering und beeinträchtigt weder die Schnelligkeit der Reaktion bis zum Eintritt des Farbumschlags noch die Empfindlichkeit.

Wird eine Dosierungseinheit verwendet, die die trockene Reagenzmischung in einer Kapsel enthält, so gibt man das Biopsat in eine kleine Menge Wasser und vermischt dieses mit dem Kapselinhalt. Bei wasserlöslichen Kapseln genügt es, die Kapsel in die wäßrige Prüflösung zu geben, wo sie sich auflöst und ihren Inhalt freigibt. Nicht oder schwer wasserlösliche Kapseln werden in der Prüflösung zerdrückt und dabei der Inhalt freigesetzt. Bei der Durchführung der Ureasebestimmung in einem Flüssigkeitsbehälter kann der pH-Indikator, falls er nicht in der Dosierungseinheit eingeschlossen war, als wäßrige Lösung zugetropfen werden.

#### Die Bestandteile der Reagenzmischung

Harnstoff wird vorzugsweise in einer Menge von 10 bis 320 mg pro Einzelbestimmung dosiert.

Als Puffersubstanzen eignen sich bekannte, in trockener Form lagfähige Substanzen, deren Pufferbereich zwischen 5,0 und 7,5, vorzugsweise 6,5 bis 7,0, liegt. Geeignet sind z.B. Kaliumdihydrogenphosphat und Dinatriumhydrophosphat. Eine Menge von 0,01 bis 1 mg pro Dosierungseinheit ist in der Regel ausreichend. Mengen über 1 Gew.-% des Dosengewichts sollten nicht verwendet werden, damit die Empfindlichkeit der Bestimmung nicht beeinträchtigt wird.

Der pH-Indikator soll einen deutlich wahrnehmbaren Farbumschlag oberhalb des Pufferbereichs, jedoch nicht oberhalb pH 9 zeigen. Geeignete Indikatoren sind nachfolgend aufgelistet, jeweils unter Angabe der Farben vor und nach dem Umschlag und der pH-Werte des Umschlagbereichs und - in Klammern - der Umschlaghalbwertstufe:

Bromkresolpurpur gelb/purpur 5,2/8,8 (6,12)

p-Nitrophenol farblos/gelb 5,0/7,0 (7,0)

Bromthymolblau gelb/blau 6,0/7,6 (7,07)

Phenolrot gelb/rot 6,8/8,4 (7,74)

Neutralrot 6,8/8,4

Chinolinblau 7,0/8,0

Kresolrot gelb/rot 7,2/8,8 (8,12)

m-Nitrophenol farblos/gelb (8,28)

m-Kresolpurpur gelb/purpur 7,4/9,0 (8,3)

Thymolblau gelb/blau 8,0/9,6 (8,89)

Mengen der Indikatoren von 0,001 bis 0,05 mg pro Dosierungseinheit sind in der Regel ausreichend. Bei der Herstellung von Komprimaten wird der Indikator in die Dosierungseinheit eingearbeitet, wenn der Farbumschlag auf der Oberfläche des Komprimats selbst beobachtet werden soll. Wird es dagegen bevorzugt, den Farbumschlag in einem getrennten Medium zu beobachten, z.B. in einer kleinen Wassermenge oder auf einem Filterpapier, so kann der Farbindikator auch darin enthalten sein.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform enthält die Dosierungseinheit weiterhin ein keimtötendes Mittel, wie z.B. p-Hydroxybenzoesäureester. Es dient bei sterilen Reagenzmischungen der Unterdrückung des Keimwachstums nach der Inkubation und kann bei nicht sterilen Präparaten die Keimvermehrung während der Lagerung verhindern.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die Reagenzmischung, wenn sie zu einem Komprimat verpreßt werden soll, einen inerten Extender. Er kann das 1- bis 50-fache Volumen der im Komprimat enthaltenen Bestandteile a bis c ausmachen und dient dazu, der für die Einzelbestimmung erforderlichen Menge der Bestandteile a, b und gegebenenfalls c eine leicht handhabbare Gestalt und Größe zu geben. Die genannten Bestandteile allein ergeben in der erforderlichen Menge eine sehr geringe Komprimatgröße, die sich weniger leicht handhaben läßt als ein

Komprimat der angestrebten Meng von 20 bis 1000, vorzugsweise 50 bis 500 mg.

Der Extender ist als inert anzusehen, wenn er die Urease-Bestimmung nicht beeinträchtigt. Er darf vor allem den pH-Wert bei der Bestimmung nicht aus dem gewünschten Bereich bringen oder den pH-Anstieg während der Ureasebestimmung unterdrücken. Weiterhin darf er die Aktivität der Urease nicht herabsetzen oder selbst auf Harnstoff hydrolysierend wirken. Schließlich darf er keine Farbstoffe enthalten, die den Farbumschlag des Indikators nicht oder schwer erkennen lassen. Geeignet sind z.B. Natriumcarboxymethyl-Stärke, Cellulose und Celluloseabkömmlinge, wie Methylcellulose, Carboxymethylcellulose, Hydroxypropylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose, sowie anorganische unlösliche Substanzen, wie Calciumcarbonat oder kolloidales Siliciumdioxid.

#### Aufbau der Dosierungseinheit

Zur Herstellung von Komprimaten werden die Bestandteile der Reagenzmischung in der gebotenen Reinheit und mit geeigneter Teilchengröße gleichförmig vermischt und in an sich bekannter Weise zu Komprimaten 1 verpreßt. Ihre Form und Größe sollte für die Durchführung von Einzelbestimmungen von Biopsaten geeignet sein. Das Gewicht eines Komprimats liegt in der Regel unter 1 g, vorzugsweise unter 500 mg, beispielsweise zwischen 20 und 200 mg. Das bevorzugte Gewicht beträgt etwa 30 mg. Die Gewichtstoleranz ist hoch. Die Form sollte der Handhabung beim Aufbringen des Biopsats und einiger Wassertropfen entgegenkommen. Vorteilhaft sind flache runde Tabletten von 3 bis 25 mm Durchmesser, wobei die Oberflächen 2 leicht konkav gestaltet sein können.

Die Komprimata können für Schnelltests zum Screening von Biopsaten unsteril verpackt werden, werden jedoch zum Ausschluß von falsch positiven Ergebnissen vorzugsweise sterilisiert.

Die für eine Dosierungseinheit vorgesehene Menge der pulverförmigen Reagenzmischung 3 kann auch in eine Steckkapsel aus zwei Kapselhälften 4, 5 abgefüllt werden. Handelsübliche Steckkapseln aus Hartgelatine oder synthetischen wasserlöslichen Polymeren sind dafür geeignet. Da in diesem Fall die Mitverwendung von Extender nicht sinnvoll ist, genügen sehr kleine Kapseln, beispielsweise von 5 bis 10 mm Größe. Es ist auch möglich, die Dosismengen zwischen zwei Metall- oder Kunststoffolien einzusiegeln oder einzuschweißen. Grundsätzlich ist jede Dosierungsform geeignet, aus der sich die trockene Reagenzmischung leicht in eine Prüflösung einbringen läßt.

#### Die Anwendung der Dosierungseinheit

Wenn alle Bestandteile a bis c der Reagenzmischung sowie gegebenenfalls ein Extender in einem Komprimat enthalten sind und das Biopsat auf dessen Oberfläche aufgebracht wird, tritt der Farbumschlag bei positivem Befund unmittelbar auf der Oberfläche des Komprimats in Erscheinung. Eine noch höhere Empfindlichkeit wird erreicht, wenn das Komprimat 1 während der Bestimmung auf einer trockenen, saugfähigen, dünnen Unterlage, z.B. einem Filterpapier 8, liegt, so daß das wäßrige Prüfm Medium dort aufgesaugt wird und den mitgeführten pH-Indikator als farbigen Ring 7 um das Komprimat erkennen läßt. Bei dieser Art der Bestimmung braucht der pH-Indikator nicht im Komprimat selbst enthalten zu sein, sondern kann sich in der saugfähigen Unterlage befinden.

Die Urease-Bestimmung kann auch in einer etwas größeren Flüssigkeitsmenge vorgenommen werden, beispielsweise 0,5 bis 2 ml. In diesem Fall werden an die Gestalt der Dosierungseinheit keine weiteren Anforderungen gestellt, als daß sie leicht handhabbar ist und die enthaltene Reagenzmischung in der Prüflösung schnell freigesetzt werden kann. Komprimata und gekapselte Dosierungseinheiten sind in gleicher Weise verwendbar. Der Farbumschlag bei Ureasegehalt ist dann in der Prüflösung selbst erkennbar.

#### Ansprüche

1. Dosierungseinheit zur Durchführung einer Ureasebestimmung mittels einer Reagenzmischung mit einem Gehalt an

a) Harnstoff

b) einer Puffersubstanz für den Bereich pH 5,0 bis 7,5,

c) und einem pH-Indikator, der im pH-Bereich zwischen 5,5 und 8,5, jedoch oberhalb des Pufferbereichs einen Farbumschlag hat, dadurch gekennzeichnet

daß die Dosierungseinheit frei von Wasser ist und wenigstens die Bestandteile a und b in einer zur Ureasebestimmung geeigneten Menge enthält.

2. Dosierungseinheit nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich ein keimtötendes Mittel enthält.

3. Dosierungseinheit nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente c Bestandteil der Dosierungseinheit ist.

4. Dosierungseinheit nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Form eines Komprimats hat.

5. Dosierungseinheit nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen inertten Extender enthält.

6. Dosierungseinheit nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einem mit einem Verschuß versehenen Behälter dicht eingeschlossen ist.

7. Dosierungseinheit nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Komprimat ein Gewicht unter 1 g, vorzugsweise unter 500 mg hat.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

5

Fig. 1

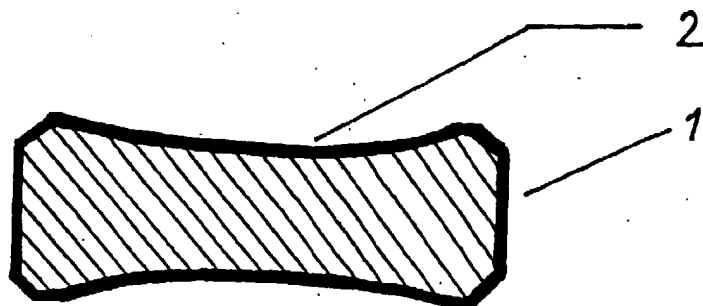


Fig. 2

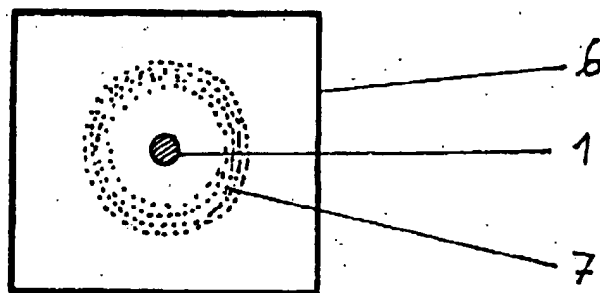
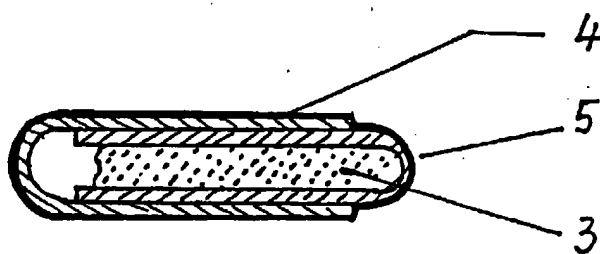


Fig. 3





Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 89 12 0602

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der wesentlichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. CL.5)
X	US-A-4 101 382 (M.K. CHANG) * Insgesamt *	1-3	C 12 Q 1/58
Y, D	EP-A-0 204 438 (B.J. MARSHALL) * Seite 4, Zeile 4 - Seite 12, Zeile 3; Seite 14, Zeile 14, Seite 15, Zeile 5; Seite 16, Zeilen 15-24; Figuren 1-3 *	1-7	
Y	US-A-3 527 674 (A. DEUTSCH) * Spalte 2, Zeile 38 - Spalte 4, Zeile 38; Spalte 6, Zeilen 23-69; Spalte 8, Zeile 49 - Spalte 9, Zeile 70 *	1-7	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. CL.5)
			C 12 Q
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 05-02-1990	Prüfer HITCHEN C.E.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		I : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument A : Mitglied der gleichen Patentfamilie, überlappendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung als betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			

EPF FORM 1500 (01/91) (P.0602)

TRANSLATE

09/ 977 555

1/34/8 (Item 4 from file: 351)

008270474

WPI Acc No: 1990-157475/199021

Anhydrous analytical unit for diagnostic determin. of  
ureasestam - in samples of gastric mucosa, comprising urea, buffer and  
opt. indicator, esp. in tablet form

Patent Assignee: ROEHM PHARMA GMBH (ROHG )

Inventor: KLEIN C J; MANN H; ROTHGANG G

Number of Countries: 011 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 369292	A	19900523	EP 89120602	A	19891107	199021 B

Priority Applications (No Type Date): DE 88014264 U 19881115

Cited Patents: EP 204438; US 3527674; US 4101382

Patent Details:

Patent No	Kind	Lang	Pg	Main IPC	Filing Notes
EP 369292	A				

Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB IT LI NL SE.  
Abstract (Basic): EP 369292 A ✓

In an analytical unit for urease determin. using a reagent consisting of urea, buffer for pH 5-7.5 and pH indicator which changes colour at 5.5-8.5 (which must be above the pH of the buffer), the unit is free of water and contains an adequate amt. (for a urease assay) of urea and/or the buffer.

The unit may also contain a germicide, the indicator and an inert extender. It is pref. formulated as a tablet of wt. below 1, pref. below 0.5 g, and may be enclosed within a sealed container.

USE/ADVANTAGE - Determin. of urease in biopsy samples of gastric mucosa is used to diagnose Campylobacter pyloridis infections. These units are easy to prepare, handle and package and have unlimited storage life. (7pp Dwg.No.0/3)

Derwent Class: B04; D16; J04

International Patent Class (Additional): C12Q-001/58

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2003 Thomson Derwent. All rights reserved.

© 2003 The Dialog Corporation

<http://www.dialogweb.com/cgi/dwclient?req=1061916245252>

8/26/03



PTO 04-2902

CY=EP DATE=19900523 KIND=A1  
PN=369 292

DIAGNOSTIC METERING UNIT FOR UREASE DETERMINATION  
[Diagnostische Dosierungseinheit zur Ureasebestimmung]

Gerhart Rothgang, et al.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE  
Washington, D.C. April 2004

Translated by: FLS, Inc.

PUBLICATION COUNTRY	(19):	EP
DOCUMENT NUMBER	(11):	0369292
DOCUMENT KIND	(12):	A1
	(13):	PUBLISHED APPLICATION
PUBLICATION DATE	(43):	19900523
PUBLICATION DATE	(45):	
APPLICATION NUMBER	(21):	89120602.1
APPLICATION DATE	(22):	19891107
ADDITION TO	(61):	
INTERNATIONAL CLASSIFICATION	(51):	C12Q 1/58
DOMESTIC CLASSIFICATION	(52):	
PRIORITY COUNTRY	(33):	DE
PRIORITY NUMBER	(31):	8814264U
PRIORITY DATE	(32):	19881115
INVENTOR	(72):	ROTHGANG, GERHART; MANN, HELMUT-JOSEF; KLEIN, CORNELIA J.
APPLICANT	(71):	RÖHM PHARMA GMBH
TITLE	(54):	DIAGNOSTIC METERING UNIT FOR UREASE DETERMINATION
FOREIGN TITLE	[54A]:	DIAGNOSTISCHE DOSIERUNGSEINHEIT ZUR UREASEBESTIMMUNG

The invention relates to a diagnostic aid in the form of a /1\*  
solid metering unit for the determination of urease. The breakdown of  
urea into ammonia and carbon dioxide through the urease enzyme is used  
analytically both for urea determination by means of reagent mixtures  
containing urease and for urease determination by means of reagent mixtures  
containing urea.

#### State of the art

Urease determination in biopsates of the gastric mucous membranes  
is of significance in the diagnosis of gastric diseases which are caused  
by infections with campylobacter pyloridis. The presence of this bacterium  
is frequently diagnosed by introducing a biopsy of the gastric mucous  
membranes into a culture medium containing urea and by adding a stain  
indicator to detect ammonia. In this case, the urease originates in the  
germs grown in the culture medium. A culture medium appropriate for this  
determination is familiar to the art as the Christensen urea agar (compare  
W.B. Christensen, Journ. Bact., 52, p. 461, 1948).

In accordance with EP-A 204438, an aqueous reagent mixture of urea,  
a bactericide, and a stain indicator are used to detect urease. The  
bactericide prevents the growth of the germs, so that only the urease  
content of the analyzed sample is determined, but not the urease which  
only developed in the test medium as a result of the introduced  
urease-forming germs.

However, in laboratory practice, the handling of the aqueous reagent  
mixture proves to be relatively cumbersome. Therefore, the mentioned

---

\* Number in the margin indicates column in the foreign text.

document proposed bringing the aqueous medium to a semi-solid state by means of formed additives, such as agar. In this form, metering units are locked into waterproof and evaporation-protected packages for individual determinations. Due to the high demands placed in these packages, their costs can far exceed those of the reagent mixture itself.

However, due to the presence of water, the urea is broken down slowly, whereby ammonia is released and a premature color change is brought about.

To prevent this, the familiar preparations contain a buffer which prevents a rise in the pH during the release of ammonia. However, because the detection of urea is based on just that release of ammonia, the amount of the buffer must be apportioned in such a way that, while it captures a small amount of hydrolytically produced ammonia, it will permit a rise in the pH and a color change of the indicator with a larger amount of 1/2 ammonia that is formed during the urease test. If the apportioned buffer amount is low, the buffer capacity is low and the shelf life of the package is limited accordingly; after the buffer has been used up, a color change occurs as a result of the progressive urea hydrolysis. If the apportioned buffer amount is higher, the buffer captures the ammonia formed by the urease, if a freshly prepared test package is used, until it is used up.

Only after that, can a color change occur. As a result, the speed of the analysis is slowed down and, above all, its sensitivity markedly deteriorates.

#### **Objective and realization**

The invention is based on the objective of providing an improved metering unit for the urease determination which is easily handled for

individual determinations, simple to package, and has an unlimited shelf life, a high sensitivity, and allows the results to be quickly recognized.

With a metering unit for carrying out the urease determination by means of a reagent mixture with a content of

a) urea,

b) a small amount of a buffer substance for the pH range 5.0

- 7.5,

c) and a pH indicator which has a color change in the pH range between 5.5 and 8.5, but above the buffer range,

these objectives are realized in that the metering unit is anhydrous and, at least, contains the components a and b in a quantity appropriate for the urease determination. The metered amounts are apportioned for an individual determination on a gastric mucous membrane biopsate, or for a defined number of such determinations.

Figures 1 and 2 serve to better explain the invention:

Figure 1 shows the cross-section through an inventive metering unit in the form of a compressed product on an enlarged scale.

Figure 2 schematically depicts an analysis arrangement.

In an enlarged cross-section, Figure 3 shows a plug-type capsule filled with the reagent mixture.

#### **Action and advantages of the invention**

The metering unit is optimally adapted to the purpose of use because it is easily handled as a sealed solid metering unit and can be inexpensively produced by using simple production methods for

/3

pharmaceutical metering units. Above all, due to the absence of water, the danger of a hydrolysis of the urea can be ruled out in storage. Also, a change of the properties due to the evaporation of water can be ruled out. This results in a nearly unlimited shelf life under the appropriate storage conditions. Due to a reduced requirement for buffer substances, the determination of urease is quicker, safer, and more accurate.

The preferred configuration of the inventive metering unit is the form of the compressed product which contains the dry components of the reagent mixture in a pressed form, usually, as a tablet. However, they may also have been filled as a powder mixture in appropriate capsules of hardened gelatine or another water-soluble or easily destroyed material. To package the metering units, any packaging means that are normally used for tablets, capsules, and similar can be employed, such as small flasks or tubes, blister packs, or foil-sealed test cups in which the urease determination is carried out.

To carry out a determination of urea by means of a compressed product, the biopsate to be analyzed is deposited on the compressed product and wetted with one or several drops of water. The buffer substance contained in the reagent mixture alone serves to set a pH value of 5.0 to 7.5, preferably, 6.5 to 7, in the aqueous test medium, which is favorable for the reaction. The amount required for this is exceptionally small and neither adversely affects the speed of the reaction until the occurrence of the color change nor the sensitivity.

If a metering unit is used which contains the dry reagent mixture in a capsule, the biopsate is added to a small amount of water and mixed

with the contents of the capsule. With water-soluble capsules, it suffices to put the capsule into the aqueous test solution, where it dissolves and releases its contents. Capsules that are not water-soluble or poorly soluble in water are crushed in the test solution while their contents are released. When carrying out the urease determination in a liquid container, the pH indicator can be dripped in as an aqueous solution, if it is not enclosed in the metering unit.

#### **The components of the reagent mixture**

Urea is preferably metered in at a quantity of 10 to 320 mg per individual determination.

Appropriate buffer substances include familiar substances which /4 can be stored in dry form, the buffer range of which is between 5.0 and 7.5, preferably, 6.5 to 7.0. Potassium hydrogen phosphate and disodium hydrophosphate are appropriate for instance. As a rule, an amount of 0.01 to 1 mg per metering unit is sufficient. Quantities in excess of 1 wt.% of the dosage weight should not be used, so that the sensitivity of the determination will not be adversely affected.

The pH indicator is to exhibit a markedly noticeable color change above the buffer range, but not above pH 9. Appropriate indicators are listed below with their respective color information prior to and after the change of the pH values of the change range and - in parentheses - the half-value step of the change:

bromocresol purple yellow/purple 5.2/6.8 (6.12)

p-nitrophenol colorless/yellow 5.0/7.0 (7.0)

bromothymol blue yellow/blue 6.0/7.6 (7.07)

phenol red yellow/red 6.8/8.4 (7.74)

neutral red 6.8/8.4

quinoline blue 7.0/8.0

cresol red yellow/red 7.2/8.8 (8.12)

m-nitrophenol colorless/yellow (8.26)

m-cresol purple yellow/purple 7.4/9.0 (8.3)

thymol blue yellow/blue 8.0/9.6 (8.89)

As a rule, indicator quantities from 0.001 to 0.05 mg per metering unit are sufficient. When compressed products are prepared, the indicator is worked into the metering unit when the color change is to be observed on the compressed product surface itself. If the observation of the color change in a separate medium is preferred, e.g., in a small amount of water or on a filter paper, the color indicator can also be contained in it.

In accordance with a preferred configuration, the metering unit also contains a germicidal agent, such as, e.g., p-hydroxy benzoate. In sterile reagent mixtures, it serves to suppress the growth of the germs after the incubation and can prevent the proliferation of germs in non-sterile preparations during storage.

In accordance with an additional preferred configuration, the reagent mixture contains an inert extender, if it is to be pressed into a compressed product. It can make up 1 to 50 times the volume of the components a to c which are contained in the compressed product and serves to give the quantity of the components a, b, and, possibly, c an easily manageable shape and size. The mentioned components alone yield a very small compressed product size in the required quantity, which is less easily



handled than a compressed product of the desired quantity of 20 to /5  
1,000, preferably, 50 to 500 mg.

The extender must be viewed as inert, if it does not adversely affect the urease determination. Above all, it must not bring the pH value out of the desired range during the determination or suppress the rise in the pH during the urease determination. Moreover, it cannot lower the activity of the urease or act in a hydrolyzing way on urea itself. Finally, it cannot contain any dyes that do not allow the color change of the indicator to be recognized, or only allow it to be recognized with difficulty. Appropriate options, e.g., include sodium carboxy methyl starch, cellulose and cellulose derivatives, such as methyl cellulose, carboxy methyl cellulose, hydroxy propyl cellulose, hydroxy propyl methyl cellulose, as well as inorganic insoluble substances, such as calcium carbonate or colloidal silicon dioxide.

#### **Setup of metering unit**

To produce compressed products, the components of the reagent mixture are uniformly mixed in the appropriate purity and suitable particle size and pressed into compressed products (1) in a manner generally familiar to the art. Their shape and size should be appropriate to carry out individual determinations of biopsates. As a rule, the weight of a compressed product is under 1 g, preferably, under 500 mg, for instance, between 20 and 200 mg. The preferred weight is about 30 mg. The weight tolerance is high. The shape should be conducive to being handled during the deposition of the biopsate and several drops of water. Flat, round

tablets from 3 to 25 mm in diameter are advantageous, whereas the surfaces (2) can be of a slightly concave shape.

The compressed products can be packaged non-sterile for quick tests for the screening of biopsates, but are preferably sterilized to rule out erroneously positive results.

The amount of the pulverulent reagent mixture (3) provided for a metering unit can also be filled into a plug-type capsule comprised of two capsule halves (4, 5). Standard commercially available plug-in capsules of hardened gelatine or synthetic water-soluble polymers are appropriate for this purpose. Because, in this case, the concurrent use of extenders does not make sense, extremely small capsules, for instance, in a size from 5 to 10 mm, are sufficient. It is also possible to seal the dosage quantities between two metal or plastic foils, or to heat-seal them. In principle, any dosage form is appropriate from which the dry reagent mixture can easily be introduced into a test solution.

#### The use of the metering unit

/6

If all components a to c of the reagent mixture, as well as, possibly, an extender, are contained in one compressed product and the biopsate is deposited on its surface, the color change appears directly on the surface of the compressed product, if the finding is positive. An even greater sensitivity is realized if the compressed product (1) lies on a dry, absorbent, thin substrate, e.g., a filter paper (6), during the determination, so that the aqueous test medium is absorbed there and lets the contained pH indicator be seen as a colored ring (7) around the compressed product. With this kind of determination, the pH indicator

does not have to be contained in the compressed product itself, but can instead be located in the absorbent substrate.

The urease determination can also be carried out in a slightly greater amount of liquid, for instance, 0.5 to 2 ml. In this case, no further requirements are placed in the shape of the metering unit other than that it is easily handled and that the contained reagent mixture in the test liquid is released quickly. The compressed product and encapsuled metering units can be used in the same manner. The color change in the event of a urease content can then be seen in the test liquid itself.

#### Claims

1. Metering unit to carry out a urease determination by means of a reagent mixture with a content of

a) urea,

b) a small amount of a buffer substance for the pH range 5.0

- 7.5,

c) and a pH indicator which has a color change in the pH range between 5.5 and 8.5, but above the buffer range, that the metering unit is anhydrous and, at least, contains the components a and b in a quantity appropriate for the urease determination.

2. Metering unit in accordance with Claim 1, characterized in that it additionally contains a germicidal agent.

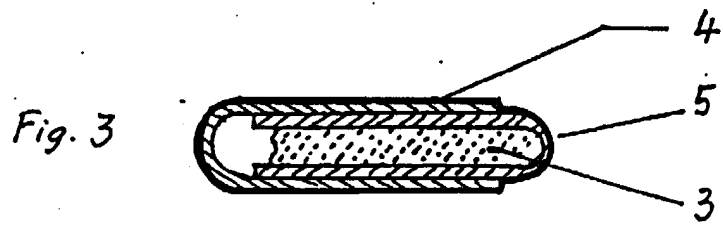
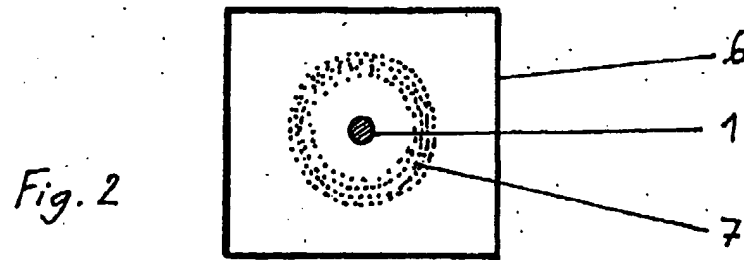
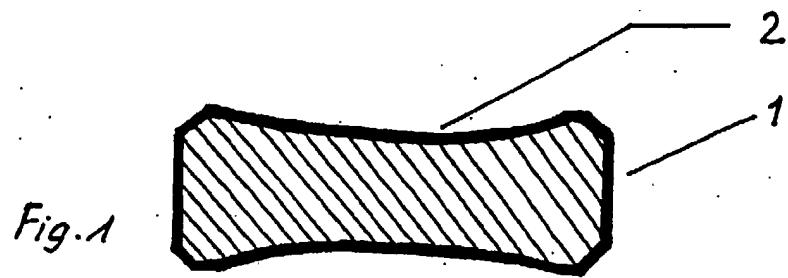
3. Metering unit in accordance with Claim 1 or 2, characterized in that the component c is a component of the metering unit.

4. Metering unit in accordance with one or several of the Claims 1 to 3, characterized in that it is in the form of a compressed product.

5. Metering unit in accordance with Claim 4, characterized in that it contains an inert extender.

6. Metering unit in accordance with one or several of the 7 Claims 1 to 4, characterized in that it is hermetically enclosed in a receptacle equipped with a seal.

7. Metering unit in accordance with Claim 4, characterized in that the compressed product has a weight under 1 g, preferably, under 500 mg.



TRANSLATE

09/ 977 555

1/34/8 (Item 4 from file: 351)

008270474

WPI Acc No: 1990-157475/199021

Anhydrous analytical unit for diagnostic determin. of  
ureaseston - in samples of gastric mucosa, comprising urea, buffer and  
opt. indicator, esp. in tablet form

Patent Assignee: ROEHM PHARMA GMBH (ROHG )

Inventor: KLEIN C J; MANN H; ROTHGANG G

Number of Countries: 011 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 369292	A	19900523	EP 89120602	A	19891107	199021 B

Priority Applications (No Type Date): DE 88U14264 U 19881115

Cited Patents: EP 204438; US 3527674; US 4101382

Patent Details:

Patent No	Kind	Lang	Pg	Main IPC	Filing Notes
EP 369292	A				

Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB IT LI NL SE.

Abstract (Basic): EP 369292 A

In an analytical unit for urease determin. using a reagent consisting of urea, buffer for pH 5-7.5 and pH indicator which changes colour at 5.5-8.5 (which must be above the pH of the buffer), the unit is free of water and contains an adequate amt. (for a urease assay) of urea and/or the buffer.

The unit may also contain a germicide, the indicator and an inert extender. It is pref. formulated as a tablet of wt. below 1, pref. below 0.5 g, and may be enclosed within a sealed container.

USE/ADVANTAGE - Determin. of urease in biopsy samples of gastric mucosa is used to diagnose Campylobacter pyloridis infections. These units are easy to prepare, handle and package and have unlimited storage life. (7pp Dwg.No.0/3)

Derwent Class: B04; D16; J04

International Patent Class (Additional): C12Q-001/58

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2003 Thomson Derwent. All rights reserved.

© 2003 The Dialog Corporation

<http://www.dialogweb.com/cgi/dwclient?req=1061916245252>

8/26/03